

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-501424

(43) 公表日 平成9年(1997)2月10日

| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I |
|---------------------------|-------|---------|----------------------|
| C 0 7 K 14/415 | Z N A | 8517-4H | C 0 7 K 14/415 Z N A |
| A 0 1 H 5/00 | Z N A | 8502-2B | A 0 1 H 5/00 Z N A A |
| A 0 1 N 37/18 | | 9450-4H | A 0 1 N 37/18 Z |
| C 0 7 H 21/04 | | 8615-4C | C 0 7 H 21/04 B |
| C 1 2 N 1/21 | | 7804-4B | C 1 2 N 1/21 |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-506274
(86) (22) 出願日 平成6年(1994)7月29日
(85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)2月2日
(86) 国際出願番号 P C T / G B 9 4 / 0 1 6 3 6
(87) 国際公開番号 W O 9 5 / 0 4 7 5 4
(87) 国際公開日 平成7年(1995)2月16日
(31) 優先権主張番号 9 3 1 6 1 5 8 . 6
(32) 優先日 1993年8月4日
(33) 優先権主張国 イギリス (G B)
(31) 優先権主張番号 9 3 1 7 8 1 6 . 8
(32) 優先日 1993年8月27日
(33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 ゼネカ・リミテッド
イギリス国 ロンドン ダブリュー1ワイ
6エルエヌ, スタンホープ ゲート 15
(72) 発明者 プロエカエルト, ヴィレム・フラン
ベルギー王国ペー1700 デイルベク, レヴ
オルドラーン 18
(72) 発明者 カムエ, ブルーノ・フィリップ・アンジェ
ロ
ベルギー王国ペー1652 アルゼンベルグ,
ジ・ベ・ヴォウテルストラート 109ア
(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗微生物性蛋白質

(57) 【要約】

ネギ属 (*Allium*) の種子から単離しうる抗微生物性蛋白質は、広範な抗真菌活性およびグラム陽性細菌に対する若干の活性を示す。これらの蛋白質をコードするDNAを単離し、ベクター中へ取り込ませることができる。このDNAで形質転換された植物を形成しうる。これらの蛋白質は抗真菌薬または抗菌薬として商業的に利用することができ、形質転換された植物は向上した病害抵抗性を示すであろう。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

1. 実質的に配列番号：1に示すアミノ酸配列を有する抗微生物性蛋白質。
2. 実質的に配列番号：16に示すアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の抗微生物性蛋白質。
3. ネギ類 (the family Alliaceae) の種子から単離しうる、請求項1または2に記載の抗微生物性蛋白質。
4. ネギ属 (the genus Allium) の種子から単離しうる、請求項3に記載の抗微生物性蛋白質。
5. 蛋白質 Ace-AMP 1である、請求項4に記載の抗微生物性蛋白質。
6. 請求項1に記載の抗微生物性蛋白質をコードするDNA。
7. 実質的に配列番号：15に示す配列を有する、請求項6に記載のDNA。
8. 請求項6に記載のDNAを保有する生物系。
9. 微生物である、請求項8に記載の生物系。
10. 植物である、請求項8に記載の生物系。
11. 真菌または細菌を請求項1に記載の抗微生物性蛋白質に暴露することを含む、真菌または細菌の駆除方法。

【発明の詳細な説明】

抗微生物性蛋白質

本発明は、抗微生物性蛋白質、それらの製造および使用方法、ならびにそれらをコードするDNA配列に関するものである。

これに関して抗微生物性蛋白質は、下記の活性のうち少なくとも1つをもつ蛋白質であると定義される：抗真菌活性（これは抗酵母活性を含む）；抗菌活性。活性には一定範囲のアンタゴニスト作用、たとえば部分阻害または死滅が含まれる。それらの蛋白質はオリゴマー状であってもよく、または単一ペプチドサブユニットであってもよい。

抗微生物活性をもつ種々の蛋白質が植物源から単離されており、それらの蛋白質は侵入または競合する微生物に対して向けられた宿主防御メカニズムに関与するとしばしば考えられている。若干の蛋白質は十分に解明されており、それらのアミノ酸配列を知ることができる。若干の例では蛋白質をコードするcDNAまたは遺伝子も単離および配列決定されている。

植物は、潜在的侵入者を排除するために広範な一連の抗真菌性化合物を構成的または誘導的に産生する。抗真菌性をもつ幾つかの群の蛋白質が現在同定されており、それには下記のものが含まれる：

キチナーゼ（シュルンバウム (Schlumbaum A) ら, 1986, Nature, 324, 363-367) ；

ベーター1, 3-グルカナーゼ（マウヒ (Mauch F) ら, 1988, Plant Physiol, 88, 936-942) ；

キチン結合性レクチン（ブレケルト (Broekaert WF) ら, 1989, Science, 245, 1100-1102；ファン・パリス (Van Parijs) ら, 1991, Planta, 183, 258-264) ；

パーマチン（ゼアマチンを含む）（ロバーツおよびセリトレニコフ (Roberts WK, Selitrennikoff CP), 1990, J Gen Microbiol, 136, 2150-2155；ビガーズ (Vigers

AJ) ら, 1991, Molec Plant-Microbe Intera

ct, 4, 315-323; ウオロシュク (Woloshuk CP) ら, Plant Cell, 3, 619-628);

チオニン (ボールマンおよびアペル (Bohlmann, Apel), 1991, Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 42: 227-240);

リボソーム不活性化蛋白質 (ロバーツおよびセリトレニコフ (Roberts WK, Selitrennikoff CP), 1986, Biosci Rep, 6, 19-29; レー (Leah) ら, 1991, J Biol Chem, 266, 1564-1573; カラスコ (Carrasco) ら, 1981, Eur J Biochem, 116, 185-189; ベルノン (Vernon) ら, 1985, Arch Biochem Biophys, 238, 18-29; スティルペおよびバルビエリ (Stirpe, Barbieri), 1986, FEBS Lett, 195, 1-8)。

これらの蛋白質は生物制御物質として使用しうる可能性があるため、かなりの関心をもたれている。

植物病原性真菌に対する活性 (およびしばしば何らかの抗菌活性) をもつ他の群の抗微生物性蛋白質を、特定の植物種から単離することができる。本発明者らは先にそれらの蛋白質の構造特性および抗真菌性につき記載した。それには下記のものが含まれる:

システインに富む小型の蛋白質 Mj-AMP 1 (抗微生物性プロテイン 1) および Mj-AMP 2: Mirabilis jalapa の種子中に存在 (カミュ (Cammu BPA) ら, 1992, J Biol Chem, 267: 2228-2233; 国際特許出願公開第 WO 92/15691 号明細書、1992 年 9 月 17 日公開);

Ac-AMP 1 および Ac-AMP 2: Amaranthus caudatus の種子から (ブレケルト (Broekaert WF) ら, 1992, Biochemistry, 37: 4308-4314; 国際特許出願公開第 WO 92/21699 号明細書、1992 年 12 月 10 日公開);

Ca-AMP1 : Capsicum annuum から、Bm-AMP1 : B
r
i
z
a
m
a
x
i
m
a から、ならびに関連の蛋白質 : D
e
l
p
h
i
n
i
u
m,
C
a
t
a
p
o
d
i
u
m, B
a
p
t
i
s
i
a および M
i
c
r
o
s
e
n
s
i
s の各種
を含む他の植物中に見出された (国際特許出願公開第WO94/11511号明
細書、1994年5月26日公開) ;

Rs-AFP1 (抗真菌性プロテイン1) およびRs-AFP2 : R
a
p
h
a
n
u
s
s
a
t
i
v
u
s の種子から (テラス (Terras FRG) ら, 19
92, J Biol Chem, 267:15301-13309)、ならびに
関連の蛋白質、たとえばBn-AFP1およびBn-AFP2 : B
r
a
s
s
i
c
a
n
a
p
u
s から、Br-AFP1およびBr-AFP2 : B
r
a
s
s
i
c
a
r
a
p
a から、Sa-AFP1およびSa-AFP2 : S
i
n
a
p
i
s
a
l
b
a から、At-AFP1 : A
r
a
b
i
d
o
p
s
i
s
t
h
a
l
i
a
n
a から、D
m-AMP1およびDm-AMP2 : D
a
h
l
i
a
m
e
r
c
k
i
i から、Cb
-AMP1およびCb-AMP2 : C
n
i
c
u
s
b
e
n
e
d
i
c
t
u
s から、
Lc-AFP : L
a
t
h
y
r
u
s
c
i
c
e
r
a から、Ct-AMP1およびC
t-AMP2 : C
l
i
t
o
r
i
a
t
e
r
n
a
t
e
a から (国際特許出願公開第
WO93/05153号明細書、1993年3月18日公開)。

これらの公開明細書は参考として本明細書に含まれるものとする。

これらおよび他の植物由来の抗微生物性蛋白質は、植物の生育期間中または収
穫後の作物保護のために作物の病害抵抗性または病害耐性を改良する殺真菌薬ま
たは抗生物質として有用である。蛋白質は植物組織から抽出するか、または微生
物内での発現により産生させるか、または合成することができる。植物病原体へ
の抗微生物性蛋白質の付与は、標準的な農業技術 (たとえば表面噴霧) を用いて
蛋白質を植物の部分に適用することにより行うことができる。これらの蛋白質は
、植物体内 (単に表面でなく) での発現により真菌性または細菌性病害に対処す
るためにも使用しうる。植物組織内へ導入した内部寄生性生物中で抗微生物性蛋
白質を発現させてもよい。抗微生物性蛋白質をコードするDNA (cDNAクロ
ーン、ゲノムDNAクローン、または標準的な核酸合成装置を用いて製造された
DNAであってもよい) を植物内へ形質転換して、トランスジェニック植物内で

蛋

白質を発現させることもできる。たとえばオオムギリボソーム不活性化蛋白質を発現するトランスジェニックタバコは、真菌性病原体 Rhizoctonia solani に対して向上した抵抗性をもち (ローゲマン (Logemann) ら, 1992, Biotechnol, 10:305-308) ; オオムギ α -チオニンを発現するトランスジェニックタバコは、Pseudomonas 属の細菌性病原体に対して向上した抵抗性をもち (カルモナ (Carmona) ら, 1993, Plant J, 3(3):457-462) ; マメキチナーゼを発現するトランスジェニックタバコは、真菌性病原体 Rhizoctonia solani に対して向上した抵抗性をもち (ブログリー (Broglie) ら, 1991, Science, 254:1194-1197) 。

最近、他の一群の植物蛋白質が植物防御における潜在的役割に関連をもつことが認められた。非特異的脂質伝達蛋白質 (以下、nsLTP と呼ぶ) は未知の機能をもつ一群の蛋白質であり、それらはインビトロで膜小胞または細胞小器官間でリン脂質を輸送する能力に基づいて脂質伝達蛋白質として分類される。これらの蛋白質は2膜系間でリン脂質または他の非極性化合物を転位させることができる。非特異的脂質伝達蛋白質は、下記を含む単子葉植物および双子葉植物の両方から単離されている :

Spinacia oleracea (So-nsLTP ; ベルンハルト (Bernhard WR) ら, 1990, Plant Physiol, 95:164-170) ;

Ricinus communis (CB-A、CB-BおよびCB-C ; タキシマ (Takishima K) ら, 1988, Eur J Biochem, 190, 107-112) ;

Daucus carota (Dc-nsLTPまたはEP2 ; スターク (Sterk) ら, 1991, Plant Cell, 9:907-921) ;

Nicotiana tabacum (TobLTP ; マスタ (Masuta C) ら, 1992, FEBS Lett; 311:119-123) ;

Hordeum vulgare (PAPI, マンディーおよびロジャース (Mundy J, Rogers JC), 1986, *Planta*, 169:

51-63;

Zea mays (Zm-nsLTP; チャン (Tchang F) ら, 1988, *J Biol Chem*, 263:16849-16855)。

これらの蛋白質は、細胞小器官間での細胞質脂質輸送、すなわち小胞体から細胞および細胞小器官膜へのリン脂質の輸送において役割をもつと従来考えられていた (アロンデルおよびカダー (Arondel V, Kader JC), 1990, *Experientia*, 46, 579-585)。しかし最近の証明は、少なくとも若干のnsLTPが細胞外に存在することを示しており、これによれば膜の生合成において提唱されているそれらの機能は考えられないものとなる (スターク (Sterk P) ら, 1991, *Plant Cell*, 3:907-921; トーマ (Thoma S) ら, 1993, *Plant J*, 3:427-436)。

本発明者らは先に、ダイコンの種子から単離された抗微生物性蛋白質であって、他の植物種から単離された非特異的脂質伝達蛋白質とそれとの相同性からRs-nsLTP (Raphanus sativus 非特異的脂質伝達蛋白質) と表示されるものにつき記載した (国際特許出願公開第WO93/05153号明細書、1993年3月18日公開)。Rs-nsLTPはインビトロで数種類の真菌の増殖を阻害し、他の植物源からの種々の非特異的脂質伝達蛋白質と38-53%の配列一致を示す。従って本発明者らは、nsLTPが微生物攻撃に対する防御において役割をもつモデルを提示した (テラス (Terras FRG) ら, 1992, *Plant Physiol*, 100:1055-1058)。

モリナ (Molina A) ら (1993, *FEBS Letters*; 316(2):119-122) は、オオムギの葉から病原体 Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus、Pseudomonas solanacearum および Fusarium solani の増殖を阻害する4種類の均一な蛋白質 (CW18、CW20、CW21

、CW22)を単離した。これらの蛋白質のアミノ酸配列は植物からの既知の n s L T P と相同であった(一致する位置32-62%)。相同蛋白質(CW41)がトウモロコシの葉から精製され、阻害性をもつことも認められた。従ってモリナ

らは植物からの非特異的脂質伝達蛋白質につき防御の役割を提唱した。国際特許出願公開第WO92/20801号明細書(Universidad Politecnica de Madrid; 1992年11月26日公開)には、リン脂質伝達蛋白質(特にオオムギ蛋白質CW18、CW20、CW21およびCW22)の抗病原体活性(特に抗菌活性)、それらの蛋白質を含有する抗病原性組成物、それらの蛋白質をコードするDNA配列、およびそれらの蛋白質を発現するトランスジェニック植物につき論じられている。

本発明者らは、植物病原性真菌に対する広域活性をもち、かつ若干の抗菌活性をもつ新規で有効な抗微生物性蛋白質を今回見出した。

本発明によれば、実質的に配列番号:1に示されるアミノ酸配列をもつ抗微生物性蛋白質が提供される。

本発明による抗微生物性蛋白質は、ネギ類(the family Alliaceae)の種子から、特にネギ属(the genus Allium)から単離することができる。それらの蛋白質は関連種および非関連種双方の種子からも単離することができ、または任意の適切な方法で調製または合成することができる。

本発明はさらに、本発明による蛋白質をコードするDNA配列、およびその配列を含むベクターを提供する。このDNAを、コードされる蛋白質の発現を可能にする生物系にクローニングまたは形質転換することができる。

他の観点においては、本発明は本発明による抗微生物性蛋白質をコードするDNAで形質転換された植物を提供する。

本発明はさらに、本発明による蛋白質に暴露することによる、真菌または細菌の駆除方法を提供する。

本発明による抗微生物性蛋白質はタマネギ(Allium cepa, onion)の種子から単離され、以下Ace-AMP1(Allium cepa-

抗微生物性プロテイン1)と呼ぶ。Ace-AMP1は一定範囲の植物病原性真菌に対して活性を示す。

Ace-AMP1蛋白質のアミノ酸配列は、蛋白質の直接配列決定により、および全長Ace-AMP1 cDNA配列の翻訳により決定された。Ace-AMP1は独特の一次構造をもつ。Ace-AMP1は種々の植物源からの非特異

的脂質伝達蛋白質(nslTP)と部分的に相同であるが、幾つかの点でnslTPと区別される。Ace-AMP1は既知のすべてのnslTPが保存残基を共有する位置の22%において異なる。nslTPと対比してAce-AMP1は著しくアルギニンに富む(93残基中19のアルギニン;アミノ酸含量の約20%がアルギニンである)。前記に述べたように、若干のnslTPは抗微生物活性を示した。しかしAce-AMP1の抗微生物活性はnslTPのものよりかなり強い(実施例7の比較試験を参照されたい)。Ace-AMP1は特に強い抗真菌活性、および特に広域の抗真菌活性を示す。さらにAce-AMP1の抗微生物活性は、生理的濃度の無機カチオンの存在下で評価した場合にnslTPのものより著しく高い。さらにAce-AMP1は脂質伝達活性をもたないと思われる。すなわち試験によれば、トウモロコシまたはコムギの種子などから単離されたnslTPと対比して、Ace-AMP1はリボソームからミトコンドリアへリン脂質を伝達し得ないことが示された。他の相違点として、Ace-AMP1をコードするcDNAクローンの構造はプレプロ蛋白質構造をもち、これに対し既知のnslTPをコードするcDNAはプレ蛋白質構造をもつ(実施例9、10および11を参照されたい)。

本発明による抗微生物性蛋白質は抗真菌活性をもち、実質的に配列番号:1に示すアミノ酸配列をもつ蛋白質である。特に本発明による抗微生物性蛋白質はアルギニンに富む。

その一次構造を知ることは、抗微生物性蛋白質またはその一部を標準的なペプチド合成装置を用いる化学合成により製造するのを可能にする。それはまた、抗微生物性蛋白質をコードするDNA構築体の製造を可能にする。DNA配列は既知のアミノ酸配列から推定するか、または配列を植物由来のDNAライブラリー

から単離することができる。

オリゴヌクレオチドプローブを既知のアミノ酸配列から誘導し、これらを用いて、前記蛋白質の一部または全部をコードするcDNAクローンを得るためにcDNAライブラリーをスクリーニングすることができる。これらの同じオリゴヌクレオチドプローブまたはcDNAクローンを用いて、ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、実際の抗微生物性蛋白質遺伝子（1または

2以上）を単離することができる。それらのゲノムクローンは植物ゲノム内で作動する制御配列を含むことができる。従って抗微生物性（またはその他の）蛋白質の発現を駆動するために使用しうるプロモーター配列を単離することもできる。これらのプロモーターは環境条件（たとえば真菌性病原体の存在）に対して特に応答性であってもよく、任意の標的遺伝子の発現を駆動するために用いることができる。

Acc-AMPI cDNAは実施例9に記載したPCRに基づくクローニングにより単離された。

抗微生物性蛋白質をコードするDNA（これはcDNAクローン、ゲノムDNAクローン、または標準的な核酸合成装置を用いて製造されたDNAであってもよい）を、次いでその蛋白質またはその蛋白質の一部を発現しうる生物系内へクローニングすることができる。DNAは構成性または誘導性プロモーターの制御下に置くことができる。誘導系の例には、病原体誘導による発現および化学的誘導が含まれる。従って蛋白質を使用するために、適切な微生物または培養細胞において産生させ、抽出し、そして単離することができる。適切な微生物には、大腸菌（Escherichia coli）、シュードモナス属菌（Pseudomonas）および酵母が含まれる。適切な細胞には、培養された昆虫細胞および培養された哺乳動物細胞が含まれる。遺伝子材料はウイルスまたはバクテリオファージ中へもクローニングすることができる。DNAを既知の方法で任意の植物種内へ形質転換し、これにより抗微生物性蛋白質を植物内で発現させることもできる。

本発明に従った植物細胞を多様な既知の方法により本発明の構築体で形質転換

することができる（アグロバクテリウム (Agrobacterium) Tiプラスミド、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、マイクロプロジェクトイルガン (microprojectile gun) など）。次いで適切な場合には、形質転換細胞を全植物体中へ再生することができ、ここで新たな核材料がゲノム中へ安定に取り込まれる。形質転換した単子葉植物および双子葉植物の両方がこの方法で得られる。

形成しうる遺伝的に修飾された植物の例には、農作物、穀類、果実および野菜

たとえば菜種、カノラ (canola)、ヒマワリ、タバコ、サトウダイコン、ワタ、ダイズ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、コメ、モロコシ、トマト、マンゴー、モモ、リンゴ、西洋ナシ、イチゴ、バナナ、メロン、パレイショ、ニンジン、レタス、キャベツ、タマネギが含まれる。

本発明の抗微生物性蛋白質は意外なほど高い活性を示し、多様な植物病原性真菌の増殖をマイクロモル未満の用量で阻止する。これらの蛋白質は広範な抗真菌活性のみでなく、グラム陽性細菌に対する活性をも示す。従ってこれらの蛋白質は殺真菌薬または抗生物質として、農業または薬剤などの用途に有用である。抗微生物性蛋白質への植物病原体の暴露は、植物に、または植物が生育する土壤に付与された微生物（内部寄生性生物を含む）内での蛋白質の発現により行われてもよい。これらの蛋白質は、標準的な農業技術（たとえば噴霧）を用いて植物の部分に蛋白質を付与することにより真菌性または細菌性病害に対処するのに使用しうる。抗微生物性組成物は、抗微生物用として有効な量の蛋白質、ならびに農業用蛋白質配合物に一般的に用いられている、農業用として受容しうるキャリアおよび／または佐剤（固体または液体佐剤、溶剤、界面活性剤など）を含むことができる。これらの蛋白質は植物の生育期間中に、または収穫後の作物保護のために、植物体内で発現させることにより真菌性または細菌性病害に対処するのに使用しうる。これらの蛋白質は哺乳動物の感染症を処置するための殺真菌薬もしくは抗菌薬として、または微生物による汚染を受けやすい製品（たとえば加工食品）の防腐にも使用しうる。

これらの抗微生物性蛋白質は適宜な種子から単離および精製するか、それらの既知のアミノ酸配列から人工的に合成するか、または適切な微生物内で組換えDNAの発現により産生させることができる。これらの蛋白質はトランスジェニック植物内で発現させてもよい。

本発明は図面を参照することによりさらに理解されるであろう：

図1は、Ace-AMP1についてのカチオン交換クロマトグラムおよび付随する真菌増殖阻止のグラフを示す。

図2は、精製Ace-AMP1のHPLCプロフィールを示す。

図3は、Ace-AMP1および種々の植物非特異的脂質伝達蛋白質のアミノ

酸配列を一行に並べたものを示す。

図4は、Ace-AMP1 cDNAおよび翻訳された蛋白質の配列を示す。

図5は、ベクターpFAJ3033およびpFAJ3034の図である。

本発明はさらに配列表を参照することによっても理解されるであろう：

配列番号：1-14は図3に示したアミノ酸配列を表す：

配列番号：1は成熟Ace-AMP1である；

配列番号：2はRs-nslTPである；

配列番号：3はSo-nslTPである；

配列番号：4はEP2である；

配列番号：5はTo-bnslTPである；

配列番号：6はLe-nslTPである；

配列番号：7はCB-Aである；

配列番号：8はCB-Bである；

配列番号：9はCB-Cである；

配列番号：10はPAPIである；

配列番号：11はCW18である；

配列番号：12はCW21である；

配列番号：13はTa-nslTPである；

配列番号：14はZm-nslTPである；

配列番号：15-16は図4の配列を表す：

配列番号：15はAce-AMP1 cDNAの核酸配列である；

配列番号：16はこのcDNA配列から翻訳されたAce-AMP1のアミノ酸配列である；

配列番号：17-25は表5に挙げたオリゴヌクレオチドを表す：

配列番号：17はOWB114である；

配列番号：18はOWB116である；

配列番号：19はOWB117である；

配列番号：20はOWB111である；

配列番号：21はOWB132である；

配列番号：22はOWB133である；

配列番号：23はOWB158である；

配列番号：24はOWB159である；

配列番号：25はOWB160である。

以下の実施例は本発明を説明するものである。

実施例1

抗真菌および抗菌活性のアッセイ

抗真菌活性は先に記載されている微量分光分析により測定された（ブレケルト（Broekaert），1990，FEMS Microbiol Lett，69：55-60）。20 μ lの（フィルター滅菌）被験溶液および80 μ lの真菌孢子懸濁液（2 \times 10⁴孢子/ml）を用いて、半濃度（half strength）バレイショデキストロースブロス（培地A）またはCaCl₂およびKClをそれぞれ1mMおよび50mMの最終濃度となるように添加した半濃度バレイショデキストロースブロス（培地B）中で、通常通り試験を行った。

カチオンのアンタゴニスト作用についての試験に関しては、合成増殖培地を用いた。合成増殖培地はK₂HPO₄（2.5mM）、MgSO₄（50 μ M）、CaCl₂（50 μ M）、FeSO₄（5 μ M）、CoCl₂（0.1 μ M）、Cu

SO_4 ($0.1 \mu\text{M}$)、 Na_2MoO_4 ($2 \mu\text{M}$)、 H_3BO_3 ($0.5 \mu\text{M}$)、 KI ($0.1 \mu\text{M}$)、 ZnSO_4 ($0.5 \mu\text{M}$)、 MnSO_4 ($0.1 \mu\text{M}$)、グルコース (10 g/l)、アスパラギン (1 g/l)、メチオニン (20 mg/l)、ミオイノシトール (2 mg/l)、ビオチン (0.2 mg/l)、チアミン-HCl (1 mg/l)、およびピリドキシン-HCl (0.2 mg/l) からなっていた。

別途明記しない限り被験生物はフザリウム・カルモラム (Fusarium culmorum) (株IMI 180420) であり、インキュベーションは 25°C で48時間行われた。試料の抗真菌活性 (単位/ ml) は、アッセイ混合物中の50%増殖阻止を与える試料の容量でアッセイ混合物の全容量を割ったものであると定義される (=50%増殖阻止に関する希釈係数)。増殖阻止率は、対照マイクロ培養物の595 nmにおける補正吸光度に対する、対照マイクロ培養物

の補正吸光度から被験マイクロ培養物の補正吸光度を差し引いたものの比率の100倍であると定義される。補正吸光度値は、48時間後に測定された培養物の595 nmにおける吸光度から30分後に測定された595 nmにおける吸光度を差し引いたものである。

抗菌活性は下記に従って微量分光分析により測定された。細菌を2%トリプトン中 30°C で回転振盪器内において一夜、前培養した。軟アガロース培地 (2%トリプトン; 0.5%低融点アガロース) に細胞密度 10^5 コロニー形成単位/ ml となるように細菌を接種した。アリコート ($80 \mu\text{l}$) の細胞懸濁液を平底96ウェルマイクロプレート内でフィルター滅菌試料 ($20 \mu\text{l}$) に添加し、凝固させた。 28°C で30分および24時間のインキュベーション後に、マイクロプレート読み取り装置により培養物の595 nmにおける吸光度を測定した。抗真菌活性アッセイにつき上記に述べたと同様に増殖阻止率を計算した。

酵母に対する抗生活性を抗菌活性の場合と同様に測定し、ただし増殖培地は半濃度バレイショデキストロースブロス (Difco) および0.5%低融点アガロースからなっていた。この培地中における酵母細胞懸濁液 (10^6 細胞/ ml) $80 \mu\text{l}$ を $20 \mu\text{l}$ の被験溶液に添加した。

実施例 2

タマネギ (Allium cepa) 種子からの塩基性、熱安定性蛋白質の抽出
 100gのタマネギ種子 (AVEVEより、ベルギー) をコーヒーマルで粉碎し、得られた粗挽き粉を4℃で2時間、10mMの NaH_2PO_4 、15mMの Na_2HPO_4 、10mMの KCl 、2mMの EDTA および2mMのチオ尿素を含有する氷冷された抽出用緩衝液200mlで抽出した。抽出後にスラリーをウェアリング (WARING) ブレンダーで混合し、次いでジャミンサーにより絞って抽出液を固体残渣から分離した。得られた抽出液を遠心分離 (5,000×gで10分) により透明化した。固体硫酸アンモニウムを上清液に添加して85%の相対飽和度となし、4℃に一夜放置することにより沈殿を生成させた。7,000×gで30分間の遠心分離後に、沈殿を100mlの蒸留水に再溶解し、蒸留水に対して十分に透析した。透析後に10倍濃度の緩衝液の添加により溶液を50mM NH_4Ac (pH9) に調整し、50mMの NH_4Ac (pH9) 中で

平衡化したQ-セファロース・ファスト・フロー (ファルマシア、スウェーデン国ウプサラ) カラム (12×5cm) に導通した。カラムを通過した蛋白質画分を凍結乾燥し、200mlの50mMの NH_4Ac (pH5.5) に再溶解した。

この材料は種子の塩基性 (pI > 9) 蛋白質画分である。この画分を実施例3の記載に従ってさらに精製した。

実施例 3

タマネギ (Allium cepa) 種子からの抗微生物性蛋白質の精製

タマネギ (Allium cepa) 抗微生物性蛋白質の単離のための出発原料は、実施例2に従って成熟種子から抽出された塩基性蛋白質画分であった。この抽出液のカチオン交換クロマトグラフィーにより蛋白質をさらに精製した。

約200ml塩基性蛋白質画分を、50mMの NH_4Ac (pH5.5) 中で平衡化したQ-セファロース・ハイ・パフォーマンス (ファルマシア) カラム (10×1.6cm) に付与した。カラムを2.0ml/分で50mMから2Mま

での NH_4Ac (pH 5.5) の直線濃度勾配により180分間にわたって溶離した。溶出液を280nmにおける吸光度のオンライン測定により蛋白質につき監視し(結果を図1の下側パネルに示す)、20mlずつの画分で採取した。それぞれの画分から1mlの試料を凍結乾燥により乾燥させ、1mlの蒸留水に再溶解し、そのうち20 μl を実施例1の記載に従って培地AおよびBの両方において抗真菌活性につきアッセイした(結果を図1の上側パネルに示す)。

クロマトグラフィーにより、抽出液はアッセイ培地(培地B)中の CaCl_2 および KCl の存在に対して異なる感受性をもつ少なくとも2種類の活性成分からなる幅広い複雑な抗真菌活性ピーク、ならびに約1.5Mの NH_4 -アセテートにおいて溶出する明瞭な活性ピークを与えた。 Ca^{2+} および K^{+} による拮抗がより少ない後者のピークを逆相HPLCによってさらに精製した。このピーク画分1mlを0.1%TFA(トリフルオロ酢酸)で平衡化したPEP-S(多孔質シリカ C_2/C_{18} 、ファルマシア)カラム(25 \times 0.4cm)に装填した。カラムを1ml/分で0.1%TFAから100%アセトニトリル/0.1%TFAまでの直線濃度勾配により50分間にわたって展開した。溶出液を280nm

における吸光度のオンライン測定により蛋白質につき監視した(結果を図2の下側パネルに示す)。1mlずつの画分を採取し、真空乾燥し、1mlの蒸留水に再溶解し、そのうち20 μl を実施例1の記載に従った抗真菌性アッセイに使用した(結果を図2の上側パネルに示す)。解像度の良好な最初の活性ピークをAce-AMP1(Allium cepa-抗微生物性プロテイン1)と呼んだ。

実施例4

精製した抗微生物性蛋白質Ace-AMP1の分子構造

精製した抗微生物性蛋白質の分子構造をさらに分析した。ドデシル硫酸ナトリウム ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を、市販のプレキャストゲル(ファストゲル(PhastGel)8-25%、ファルマシアから)上でファストシステム(PhastSystem)(ファルマシア)電気泳動装置により実施した。試料用緩衝液は、200mMのトリス-HCl(pH8.

3)、1% (w/v) SDS、mMのEDTA、0.005%ブロモフェノールブルー、および別途明記しない限り1% (w/v) ジチオエリトリール (DTE) を含有していた。電気泳動後に蛋白質を12.5%グルタルアルデヒド中で固定し、銀染色した: ヒュークショーベンおよびデルニック (Heukeshoven, Dernick) (1985, Electrophoresis, 6: 103-112) に従う。比較のために泳動させた分子量マーカーは下記のものであった: ホスホリラーゼB (97.4 kDa)、ウシ血清アルブミン (66.2 kDa)、オボアルブミン (42.7 kDa)、カルボニックアンヒドラーゼ (31.0 kDa)、ダイズトリプシンインヒビション (21.5 kDa)、およびリゾチーム (14.4 kDa)。

還元および非還元Ace-AMP1のSDS-PAGE分析により、それぞれ約10 kDaおよび22 kDaの単一バンドが認められた。分子量約10 kDaの還元Ace-AMP1は、20 kDa未満の蛋白質につき高い解像が可能なファストゲル・ハイ・デンシティー (PhastGel High Density) (ファルマシア) 上での同様なSDS-PAGEによって確認することができた。スーパーローズ-12 (Superose-12) (ファルマシア) 上でのゲル濾

過による天然Ace-AMP1の分子量測定によれば、約7.5 kDaの値が得られた。非還元Ace-AMP1についての22 kDaというSDS-PAGE分子量値は、この小型の蛋白質のSDS結合能が比較的低いことによる過大評価の可能性がある。

デュボア (Dubois) ら (1956, Anal Chem, 28: 350-356) のフェノール-硫酸法、および基準としてのD-グルコースを用いた共有結合糖の測定は陰性であり、Ace-AMP1はグリコシル化されていないことが示唆された。

非還元Ace-AMP1は遊離チオール基を含まなかったため、Ace-AMP1のシステイン残基はすべてジスルフィド結合に関与していると思われる。チオール基測定は、エルマン (Ellman, GL) (1959; Arch Bi

ochem Biophys, 82, 70-74) のジチオニトロ安息香酸法により10mlの蛋白質を用いて行われた。還元蛋白質試料は10mMのDTTと45℃で1時間反応させたのち蒸留水に対して十分に透析することにより調製された。

実施例5

Ace-AMP1のアミノ酸配列決定

システイン残基をカミュ (Cammue BPA) ら, 1992; J Biol Chem, 267: 2228-2233の記載に従ってS-カルボキシアミドメチル化により修飾した。試薬をPeper-S (多孔質シリカC₂/C₁₈) (ファルマシア) カラム (25×0.4cm) 上でのHPLCにより除去した。S-カルボキシアミドメチル化蛋白質が、カラムを0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) から0.1%TFA含有アセトニトリルまでの直線濃度勾配で溶離することにより回収された。得られた蛋白質画分を477Aプロテイン・シーケンス (アプライド・バイオシステムズ) により、120Aアナライザー (アプライド・バイオシステムズ) によるフェニルチオヒダントインアミノ酸誘導体のオンライン検出を用いて、アミノ酸配列分析した。

Ace-AMP1を配列決定する最初の試みにより、蛋白質はN末端遮断されていることが示された。ピログルタメートアミノペプチダーゼ (ベーリンガー、

FRG) による脱遮断が行えなかったので、Ace-AMP1をエンドプロテイナーゼArg-CおよびAsp-N (両方とも配列決定用、ベーリンガー、FRGから) で消化した。消化は製造業者の指示に従って、還元化およびS-カルボキシアミドメチル化Ace-AMP1につき、推奨された最小の蛋白質/酵素比 (w/w) および推奨された最大インキュベーション時間を適用して行われた。次いで消化されたペプチドを、Peper-S (多孔質シリカC₂/C₁₈; ファルマシア) カラム (25×0.4cm) 上で、0.1%TFAから0.1%TFA含有アセトニトリルまでの直線溶離濃度勾配を100分で1ml/分において用いるRP-HPLCにより分離した。Arg-Cによる消化によって少なくとも10種類の分離可能なペプチドが得られ、これは既にAce-AMP1の比較的高

いアルギニン含量を示唆した。Asp-Nによる処理は3種類の蛋白質フラグメントを生成した。これらのペプチドを配列決定したのち、遮断されたN末端部分を除いてAce-AMP1の一次構造を再構築した。

Ace-AMP1アミノ酸配列は、下記を含めた種々の植物源からの非特異的脂質伝達蛋白質 (nsLTP) と部分的に相同性であることが見出された: Rs-nsLTP、Raphanus sativusの種子から (テラス (Terras FRG) ら, 1992, Plant Physiology, 100: 1055-1058) ; So-nsLTP、Spinacia oleraceaの葉から (ベルンハルト (Bernhard WR) ら, 1991, Plant Physiology, 95: 164-170) ; Ep2、Daucus carotaの接合胞子から (zygotic embryo) (スターク (Stark) ら, 1991, Plant Cell, 3: 907-921) ; TobLTP、Nicotiana tabacumの花から (マスタ (Masuta C) ら, 1992, FEBS Lett; 311: 119-123) ; Le-nsLTP、Lycopersicon esculenteから (トネスーシュマン (Tonnes-Schumann S) ら, 1992, Plant Mol Biol, 18: 749-757) ; CB-A、CB-BおよびCB-C、Ricinus communis若木から (タキシマ (Takishima K) ら, 1988, Eur J Biochem, 190, 107-11

2) ; PAPI、Hordeum vulgareの種子から (マンディーおよびロジャース (Mundy J, Rogers JC) , 1986, Planta, 169: 51-63 ; CW18およびCW21、Hordeum vulgareの葉から (モリナ (Molina A) ら, 1993, FEBS Lett; 316: 119-122) ; Ta-nsLTP、Triticum aestivumから (シモレ (Simorre JP) ら, 1991, Biochem, 30: 11600-11608) ; Zm-nsLTP、Zea maysの若木から (チャン (Tchang F) ら, 1988, J Biol Chem, 263: 16849-16855) 。 Ace-AMP1とこれらのnsLTP

の配列の比較を図3に示す。最適な並列のために導入したギャップを点線で示す。最初の9個のN末端アミノ酸はA c e - A M P 1 c D N A のヌクレオチド配列に由来する（実施例5参照）。

図3に示したn s L T P配列（A c e - A M P 1以外のすべての配列）の比較から、以下のコンセンサスモチーフが導かれる。8個のシステインは保存された4、14、30、31、51、53、77および93位にある（番号は図3に示したもの）：疎水性残基（L、I、A、V、M）または芳香族残基（F、W、Y）は、2、7、11、17、18、34、37、41、54、61、64、69、73、82、85、87および96位にある；プロリンは25および74位にある；塩基性残基（H、R、K）は47および55位に保存される；ヒドロキシ残基（S、T）は43および88位にある；ならびに保存されたアスパラギン酸は46位を占める。A c e - A M P 1はこのコンセンサスモチーフに部分的に一致するが、下記の位置において異なる：2、18、61および69位に疎水性／芳香族残基をもたない；それぞれ46、55および88位の保存されたアスパラギン酸、リシンおよびセリンをもたない。従ってn s L T P蛋白質の保存残基のうち約22%がA c e - A M P 1においては変化している。さらにA c e - A M P 1は、はるかに高いアルギニン含量により他のすべての既知n s L T P配列と異なる。A c e - A M P 1は少なくとも19個のアルギニンを含むが、n s L T P蛋白質中のアルギニンの数は1個（S o - n s L T P）から6個（Z m - n s L T P）の範囲である。

動物に見出されるシステインに富む抗生性ペプチドの大部分、たとえばデフェンシン（レーラー（L e h r e r R I）ら、1991, C e l l , 64:229-230）、 β -デフェンシン（セルステッド（S e l s t e d M E）ら、1993, J B i o l C h e m , 268:6641-6648）、およびバクテネシン（ロメオ（R o m e o D）ら、1988, J B i o l C h e m , 263:9573-9575；ゲナロ（G e n n a r o R）ら、1989, I n f e c t i m m u n , 57:3142-3146）も特にアルギニンに富むことが注目される。

実施例6

蛋白質の抗真菌活性の安定性

表1にAce-AMP1の抗真菌活性の安定性についての他の試験の結果をまとめる。

Fusarium culmorumの孢子を含有する増殖培地で5倍希釈した試料20 μ lを用いて、抗真菌活性についての試験を実施例1に記載したアッセイ法に従って実施した。未処理対照試料は10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7)中の100 μ g/mlの被験蛋白質からなっていた。被験蛋白質のアリコート最高100℃の種々の温度で10分間加熱することにより、熱安定性試験を行った。消化のためにプロテアーゼを400 μ g/mlで添加し、37℃で16時間インキュベートした。

表1

Ace-AMP1の抗真菌活性の安定性

| 処理 | 相対的抗真菌活性 (対照活性に対する%) |
|-------------|-------------------------|
| 対照 | 100 |
| 80℃で10分の加熱 | 100 |
| 90℃で10分の加熱 | 100 |
| 100℃で10分の加熱 | 100 |
| キモトリブシン消化 | 80 |
| プロナーゼE消化 | 5 |
| プロテイナーゼK消化 | 60 |
| トリブシン消化 | 90 |

Ace-AMP1の抗真菌活性は最高100℃までの10分間の熱処理により影響されなかった。Ace-AMP1はキモトリブシン、トリブシンおよびプロテイナーゼKによる処理に対して比較的抵抗性であったが、プロナーゼEによる消化は活性をほぼ完全に低下させた。

実施例7

Ace-AMP1の抗真菌効力

精製蛋白質の抗真菌効力を種々の植物病原性真菌に対して、実施例1に記載したアッセイ法を用いて評価した。真菌の増殖、真菌胞子の採集および収穫は先の記載（ブレケルト（Broekaert）ら、1990, FEMS Microbiol Lett, 69:55-60）に従って行われた。下記の真菌株を用いた：Alternaria brassicola MUCL 20297、Ascochyta pisi MUCL 30164、Botrytis cinerea MUCL 30158、Colletotrichum lindemuthianum MUCL 9577、Fusarium culmorum IMI 180420、Fusarium oxysporum f. sp. pisii IMI 236441、Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici MUCL 909、Nectria haematococca コレクション・ファン・エッテン160-2-2、Phoma betae MUCL 9916、Pyrenophora tritici-repentis MUCL 30217、Pyricularia oryzae MUCL 30166、Verticillium dahliae MUCL 6963。

真菌用合成増殖培地（SMF）（実施例1参照）にそれぞれ最終濃度1mMおよび50mMとなるようにCaCl₂およびKClを補充したもの（SMF⁺）または補充しないもの（SMF⁻）を用いて、抗真菌性蛋白質の系列希釈液を真菌に付与した。増殖阻止率%を微量分光分析により測定した。48時間のインキュベーション後に50%増殖阻止に要した濃度（IC₅₀値）を用量応答曲線から計算した。

種々の植物病原性真菌に対するAce-AMP1のIC₅₀値を表2に提示し、それらを同一条件下で下記の3種類のnsLTPについて測定したものと比較する：Rs-nsLTP（データはテラス（Terras）ら、1992, Plant Physiol, 100:1055-1058より得た）、Zm-nsL

TPおよびT a - n s L T P (シモレ (S i m o r r e) ら, 1991, B i o c h e m, 30:11600-11608の記載に従って単離)。

培地SMF⁻およびSMF⁺の両方において、A c e - A M P 1は10 μ g/ml (約1 μ Mに相当) 以下の濃度で12種類の被験真菌すべてを50%阻止する。従ってA c e - A M P 1は広域阻止スペクトルを示す有効な植物抗真菌性蛋白質である。

A c e - A M P 1がSMF⁺においてSMF⁻におけるとほとんど同様に有効であるのは驚くべきことである。すべての植物細胞コンパートメントは比較的高いカチオン濃度を含有するので、SMF⁺のようにカチオンを含有する培地において抗真菌性蛋白質が活性であるのは生理学的に妥当である (テラス (T e r r a s F R G) ら, 1992, J B i o l C h e m, 267:15301-15309)。

SMF⁺中におけるA c e - A M P 1の効力は他の比較的カチオン不感受性である抗真菌性蛋白質、たとえば表2に挙げた12中8の真菌を10 μ g/ml未満の濃度で阻害するR s - A F P 2に匹敵する (テラス (T e r r a s F R G) ら, 1992, J B i o l C h e m, 267:15301-15309)。またA c e - A M P 1は最近報告された、A c e - A M P 1に部分的に相同な (図3参照) R a p h a n u s s a t i v u sからのn s L T P様蛋白質であるR s - n s L T P (テラス (T e r r a s F R G) ら, 1992, P l a n t P h y s i o l, 100:1055-1058) よりはるかに効力が高い。実際に、表2に挙げた真菌はいずれもSMF⁺中においてR s - n s L T Pにより100 μ g/ml未満の濃度では阻害されない (テラス (T e r r a s F R G) ら, 1992, P l a n t P h y s i o l, 100:1055-1058)。さらにトウモロコシおよびコムギから単離された2種類のn s L T P、それぞれZ m - n s L T PおよびT a - n s L T Pは、SMF⁺中において試験した9真菌のいずれの増殖も200 EMG/ML未満の濃度では阻害しなかった (表2参照)。オオムギの葉から単離されたn s L T P蛋白質 (C W 1 8およびC W 2 1を含む、図3参照) の、F u s a r i u m s o l a n iに対するI C₅₀値は

、培地としてのバレイショデキストロースブロース中で評価を行った際に約25-180 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (イソ型に応じて) であった (モリナ (Molina A) ら, 1993, FEBS Lett; 316:119-122)。しかし他の真菌に対するこれらの蛋白質の活性およびカチオンに対するそれらの感受性については記載されていない。

種々のカチオンを補充した合成増殖培地における Fusarium culmorum に対する Ace-AMP1 の活性 (実施例1の記載に従ってアッセイ) を、Amaranthus caudatus の種子からの Ac-AMP1 抗微生物性ペプチド (ブレケルト (Broekaert) ら, 1992, Biochemistry, 31:4308-4314)、およびコムギ内胚乳からの β -ピューロチオニン (抗微生物活性をもつ他のタイプの植物種子蛋白質; レッドマンおよびフィッシャー (Redman DG, Fischer N), 1969

J Sci Food Agri, 20:427-432) の活性と直接に比較した。表3に種々の条件下での IC₅₀ 値をまとめる。Ace-AMP1 は試験したすべてのカチオンの存在に対して極めて感受性であるが、Ac-AMP1 および β -ピューロチオニンの活性はむしろカチオンにより刺激されると思われる。ただし Ca^{2+} によっては刺激されない。しかし Ca^{2+} の拮抗作用はチオニンに対してより Ace-AMP1 に対しての方がはるかに低い。

表 2

種々の植物病原性真菌に対するAce-AMP1、
Rs-nsLTP、Zm-nsLTPおよびTa-nsLTPの抗真菌活性

| 真菌 | IC ₅₀ (μg/ml) | | | | | |
|---------------------------|--------------------------|------|----------|-------|----------|------|
| | Ace-AMP1 | | Rs-nsLTP | | Zm-nsLTP | |
| | SMF- | SMF+ | SMF- | SMF+ | SMF- | SMF+ |
| <u>A brassicola</u> | 2.5 | 1.5 | 48 | 500 | >200 | >200 |
| <u>A pisi</u> | 1.0 | 10.0 | 41 | 700 | >200 | >200 |
| <u>B cinerea</u> | 3.0 | 7.0 | 45 | 680 | nd | nd |
| <u>C lindemuthianum</u> | 1.5 | 1.5 | 25 | >1000 | >200 | >200 |
| <u>E culmorum</u> | 6.0 | 10.0 | 20 | 520 | 200 | >200 |
| <u>F oxysporum pisi</u> | 3.5 | 4.0 | 58 | 900 | 200 | >200 |
| <u>F oxysporum</u> | | | | | | |
| <u>lycopersici</u> | 3.0 | 10.0 | 54 | >1000 | 200 | >200 |
| <u>N haematococca</u> | 3.5 | 7.0 | 100 | >1000 | 60 | >200 |
| <u>P betae</u> | 1.5 | 7.0 | 18 | 750 | 150 | >200 |
| <u>P tritici-repentis</u> | 3.0 | 3.5 | nd | nd | nd | nd |
| <u>P oryzae</u> | 3.0 | 7.0 | 10 | >1000 | nd | nd |
| <u>V dahliae</u> | 0.25 | 0.5 | 7 | 135 | 200 | >200 |

(nd = 測定されなかった)

表3

種々のカチオンを補充した合成増殖培地における

Fusarium culmorumに対するAce-AMP1、Ac-AMP1および β -ピューロチオニンの抗真菌活性

| | IC50 ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | |
|------------------|---------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | SMF | +50 mM K+ | +50 mM Na+ | +50 mM NH ₄ + | +5 mM Mg ²⁺ | +5 mM Ba ²⁺ | +5 mM Ca ²⁺ |
| Ace-AMP1 | 3 | 2 | 2 | 1.5 | 2 | 2 | 6 |
| Ac-AMP1 | 4 | 100 | 100 | 50 | >200 | >200 | >200 |
| β -ピューロチニン | 4 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2.5 | 35 |

実施例8

Ace-AMP1の抗菌および抗酵母活性

精製蛋白質を、下記の細菌の増殖に対するその作用につき評価した：Bacillus megaterium ATCC 13632、Sarcina lutea ATCC 9342、Agrobacterium tumefaciens LMG 188、Alcaligenes eutrophus LMG 1195、Azospirillum brasilense ATCC 29145、Erwinia carotovora subsp carotovora LMG 2458、Escherichia coli HB101株、Pseudomonas solanacearum LMG 2293、Pseudomonas syringae pv tabaci LMG 5192、およびXanthomonas campestris pv campestris LMG 582。それをSaccharomyces cerevisiae Sp1株の増殖に対する作用についても評価した。バイオアッセイは実施例1の記載に従って実施された。結果を表4にまとめる。

表 4

細菌および酵母に対するAce-AMP1、
Rs-nsLTP、Zm-nsLTP、Ta-nsLTPの活性

| 微生物 | IC50 (μg/ml) | | | |
|-----------------------|--------------|----------|----------|----------|
| | Ace-AMP1 | Rs-nsLTP | Zm-nsLTP | Ta-nsLTP |
| <u>B megaterium</u> | 0.8 | 20 | 60 | >200 |
| <u>S lutea</u> | 8.0 | >200 | >200 | >200 |
| <u>A tumefaciens</u> | >200 | nd | nd | nd |
| <u>A eutrophus</u> | >200 | nd | nd | nd |
| <u>A brasiliense</u> | >200 | nd | nd | nd |
| <u>E carotovora</u> | >200 | >200 | >200 | >200 |
| <u>E coli</u> | >200 | nd | nd | nd |
| <u>P solanacearum</u> | >200 | nd | nd | nd |
| <u>P syringae</u> | >100 | >200 | >200 | >200 |
| <u>X campestris</u> | >100 | >200 | >200 | >200 |
| <u>S cerevisiae</u> | >200 | nd | nd | nd |

nd = 測定されなかった

Ace-AMP1は試験した両方のグラム陽性細菌 (B megaterium および S lutea) の増殖を阻害するが、試験した8種のグラム陰性細菌のいずれに対しても、または酵母 S cerevisiae に対しても作用をほとんど又は全く及ぼさなかった。Rs-nsLTPおよびZm-nsLTPはB megaterium に対してのみ阻害性ではあったが、この細菌に対してAce-AMP1より少なくとも10倍は活性が低かった。オオムギの葉から単離されたns-LTP (CW18およびCW21を含む、図3参照) は、グラム陽性細菌 Clavibacter michiganensis subsp sepedonicus およびグラム陰性細菌 P solanacearum の増殖を阻害すると報告されている (モリナ (Molina) ら, 1993, FEB S Lett; 316:119-122)。

実施例 9

Ace-AMP1 cDNAの5' および3' 部分のPCRに基づくクローニング

開花の15、21および30日後に採集した未熟な種子の混合物から全RNAを抽出した。

Ace-AMP1 cDNAの3'部分を下記によりクローニングした。12単位のトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（ベーリンガー・マンハイム）、適宜な緩衝液成分（サムブルック（Sambrook）ら、1989, Molecular Cloning, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス）、および10 pmolの修飾されたオリゴdTプライマー（プライマーOWB114、表5参照）を含有する30 μ lの反応混合物中で、全RNA（1 μ g）を逆転写し、52℃で30分間インキュベートした。逆転写反応物の一部（0.5 μ l）を、5 pmolのアンチセンスプライマーOWB114、5 pmolのセンスプライマーOWB111（Ace-AMP1の内部アミノ酸配列、すなわちPRFQNI Pに対応する縮重プライマー）、5 nmolのdNTP、0.5単位のTaqポリメラーゼ、およびTaqポリメラーゼ用緩衝液成分（サムブルック（Sambrook）ら、1989, Molecular Cloning, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス）を含有する25 μ lのPCR反応混合物に移した。標準的な条件（サムブルック（Sambrook）ら、1989, Molecular Cloning, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス）に従って、プライマーアニーリング温度55℃を用いて、PCRのための温度サイクル工程を実施した。PCR反応生成物をアガロースゲル電気泳動により分析し、約400 bpのバンド（同一鋳型を含むが、両プライマーのうち一方のみを含む対照PCR反応には存在しなかったもの）をPrep-a-Geneキット（バイオラド）を用いて、製造業者の指示に従って単離した。PCR生成物をXba Iで消化し、プラスミドpEMBL18+（ベーリンガー・マンハイム）中へサブクローニングし、この挿入配列をALF自動シーケンサー（ファルマシア）でオートリード（Autoread）配列決定キット（ファルマシア）を用いて蛍光標識M13正方向および逆方向プライマーにより配列決定した。

Ace-AMP1 cDNAの5'部分を下記によりクローニングした。前記に従ってOWB114またはOWB133（Ace-AMP1特異的プライマー

Ace-AMP1 cDNAの3'部分のヌクレオチド配列に由来する)をプライマーとして用いて、全RNAを逆転写した。10mMのトリス、1mMのEDTA、300mMのNaCl、0.05%(w/v)のSDS(pH8)中で平衡化したクロマスピリン(Chromaspin)+TE-100(クローンテック)カラムでのゲル濾過により、過剰のプライマーを除去した。次いでRNAをアルカリ加水分解により除去し、デロルト(Delort)ら(Nucl Acids Res, 17:6439-6448)の記載に従ってssDNAをエタノール沈殿させ、最後に10 μ lの蒸留水に再溶解した。これらのssDNA調製物の3'末端(mRNAの5'末端に対応)を、ホスフェート基をその5'末端にもち(ssDNAへのライゲーションを可能にするために)、かつアミノ基をその3'末端にもつ(プライマーの自己ライゲーションを避けるために)ように合成されたオリゴヌクレオチドOWB116にライゲートした。ssDNAライゲーション反応混合物(30 μ l)は、5pmolのプライマーOWB116、2.5 μ lのssDNA(前記参照)、10単位のT4 RNAリガーゼ(ニュー・イングランド・バイオラボズ)、およびT4 RNAリガーゼ用緩衝液成分(テシール(Tessier)ら, 1986, Anal Biochem, 158:171-178)を含有し、インキュベーションは22℃で16時間行われた。ssDNAライゲーション反応混合物の一部(0.1 μ l)を、5nmolのプライマーOWB117(OWB116に対して部分的に相補性である)、5mmolのdNTPs、1.25単位のTaqポリメラーゼ、およびTaqポリメラーゼ用緩衝液成分を含有する25 μ lのPCR反応混合物に移した。アニーリング温度60℃での5PCRサイクル後に、25pmolのAce-AMP1特異的プライマー(OWB132、OWB133の位置のすぐ上流の、Ace-AMP1 cDNAの位置に対応)を反応混合物に添加し、アニーリング温度55℃においてさらに30PCRサイクルを実施した。単一プライマーPCR対照に存在しなかった約400bpのPCR反応生成物を前記に従ってゲル精製した。第1鎖合成にOWB113またはOWB114のいずれを用いたかに関係なく、

同じ400bpのPCRバンドが得られた。このPCR生成物をBamHI消化し、pEMBL18+中へサブクローニングし、挿入配列のヌクレオチド配列を前記

に従って決定した。

5' および3' 部分のヌクレオチド配列(38ヌクレオチドが重複)を結合させることにより、全長Ace-nslTP cDNAに相当する686bpの配列が得られた。

Ace-AMP1 cDNAは、132アミノ酸をコードする396bpの読み取り枠(open reading frame)、36bpの5' 側リーダー配列、およびポリ(A+)テイルに至るまでに232bpの3' 側非翻訳領域を含む(図4)。コード領域の分析により、27アミノ酸の推定シグナルペプチドの存在が明らかになった。予想シグナルペプチド開裂部位(図4に矢印で示した)は、フォン・ハイジン(von Heijne)(1986, Nucl Acids Res, 14: 4683-4690)の規則、および大部分の成熟植物nslTPは4位にシステインおよび7位にバリンをもつという所見と一致する。コード領域のアミノ酸37と120の間のアミノ酸配列(図4に下線を施した)は、成熟Ace-AMP1につき実験的に決定されたアミノ酸配列と一致する。cDNA由来のコード領域は、成熟Ace-AMP1が実施例5において決定された配列と対比してN末端にさらに9個のアミノ酸をもつことを予想させた。この配列は、成熟Ace-AMP1には遮断されたN末端アミノ酸が存在するため実験的に決定することはできなかった。さらにAce-AMP1 mRNAの翻訳生成物はそのカルボキシル末端に成熟Ace-AMP1には存在しない12アミノ酸をもつ。このカルボキシル末端プロペプチドは疎水性および酸性の残基に富み、これは液胞性(vacuolar)植物蛋白質の前駆物質中に存在するカルボキシル末端プロペプチドの特徴的な点である(ナカムラおよびマツオカ(Nakamura, Matsuoaka), 1993, Plant Physiol, 101:1-5)。

それらのカルボキシル末端プロペプチドは多数の例において、蛋白質を液胞へ標的定め(targetting)するための決定因子であることが証明されている(ベド

ナレクおよびレイケル (Bednarek, Raikhel), 1991, Plant Cell, 3:1195-1206; ノイハウス (Neuhaus) ら, 1991, Proc Natl Acad Sci USA, 88:10362

-10366)。nsLTP様蛋白質はすべてAce-AMP1の場合に見られるプレプロ蛋白質構造と異なるプレ蛋白質として翻訳されることが示された (アロンデルおよびカダー (Arondel, Kader), 1990, Experientia, 46:579-585; マドリッドおよびフォン・ウェットスタイン (Madrid, von Wettstein), 1991, Plant Physiol Biochem, 29:705-711)。

表5

Ace-AMP1 cDNAクローニングに用いたオリゴヌクレオチド

| 名称 | 配列 |
|--------|---|
| OWB114 | 5'-CCACTCTAGAGAATTCACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' |
| OWB116 | 5'-AGAATTCGCATTGCATCGGATCCATGATCGAT-3' |
| OWB117 | 5'-ATCGATCATGGATCCGATGCAATGC-3' |
| OWB111 | 5'-AATTCTAGACCNMGNTTYCARAAYATHCC-3' |
| OWB132 | 5'-ATCGGATCCGAATTCGTGTTGCGACAATCACGAGG-3' |
| OWB133 | 5'-ATCGGATCCGAATTCAGGACGAACAAAGGTGTTGC-3' |
| OWB158 | 5'-TAAGGTACCATGGTTCGCGTTGTATC-3' |
| OWB159 | 5'-TAAGGATCCTTCAGTTAATCCTGCCGCATTGAATTCG-3' |
| OWB160 | 5'-TAAGGATCCCTTCATTCCTCAGCGTCCAAG-3' |

以下のオリゴヌクレオチドはAce-AMP1 mRNAに対してセンス配向をもつ：OWB117、OWB111、OWB158。残りのオリゴヌクレオチド（OWB114、OWB116、OWB132、OWB133、OWB159、OWB160）はAce-AMP1 mRNAに対してアンチセンス配向をもつ。Ace-AMP1 cDNAヌクレオチド配列に対する各オリゴヌクレオチドの位置は以下のとおりである：

| | |
|--------|------------------------|
| OWB114 | ポリ(A ⁺)テイル |
| OWB116 | 5' 末端 |
| OWB117 | 5' 末端 |
| OWB111 | 307-326 |

OWB132 325-344

OWB133 338-354

OWB158 35-53

OWB159 372-396

OWB160 417-437。

オリゴヌクレオチド中の制限部位は表5に下線を施した。OWB116においては、5'末端の5' OHがリン酸化され、3'末端の3' OHがアミノ化されている。OWB117の配列は、OWB116のヌクレオチド8-32に対して相補的である。OWB111においては：N=G、A、T、C；H=A、C、T；M=A、C、；Y=C、T；R=A、G。

実施例10

発現ベクターの構築

プライマーOWB114を用いて実施例9の記載に従って全タマネギ種子RNAを逆転写した。反応混合物の一部（0.5 μ l）を標準的な条件下で（サムブルック（Sambrook）ら，1989，Molecular Cloning，コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス）、プライマーの組み合わせOWB158-OWB159をプライマーアニーリング温度65℃で、またはプライマーOWB158-OWB160をプライマーアニーリング温度55℃で用いる、PCR増幅反応に使用した。プライマーOWB158はAce-AMP1 cDNA（開始コドンを含む）の天然NcoI部位のすぐ上流にKpnI部位を導入し、プライマーOWB159はアミノ酸120（成熟Ace-AMP1の最終アミノ酸）のコドンの後方に終止コドンおよびBamHI部位を導入し、プライマーOWB160はAce-AMP1の天然終止コドンの後方にBamHI部位を導入する。得られたOWB158-OWB159およびOWB158-OWB160増幅生成物をKpnIおよびBamHIで消化し、プラスミドpBluescript II SK-の対応する部位へサブクローニングして、それぞれプラスミドpAce2およびpAce1を得た。これらの挿入配列をヌクレオチド配列決定により確認した。プラスミドpAce1およびpAce2の挿入配列をNcoIおよびSacIで消化することにより単離し、次いで

発

現ベクターpBI505の対応する部位へライゲーションし（デトラ（Detla）ら，1993，Plant Science，94：139-149）、こうしてそれぞれプラスミドpAce3およびpAce4を形成した。発現ベクターpAce3においては、Ace-AMP1のコード領域はその5'末端において、重複エンハンサー要素をもつカリフラワーモザイクウイルスの35S RNAの強力な構成性プロモーター（高い転写活性を得るため、ケイ（Kay）ら，1987，Science，236：1299-1302）、およびアルファルファモザイクウイルスの5'側リーダー配列（高い翻訳活性を得るため、ダトラ（Datla）ら，1993，Plant Science，94：139-149）でフランキングされている。Ace-AMP1 cDNAのコード領域はその3'末端においては、Agrobacterium tumefaciensノパリンシンターゼ遺伝子のポリアデニル化配列でフランキングされている（ベバン（Bevan）ら，1983，Nature，304：184-187）。ベクターpAce4は、コード領域がプロペプチドの12カルボキシル末端アミノ酸をコードするドメインを欠如する点以外はpAce3と同一である。

実施例11

植物形質転換ベクターの構築

実施例10に記載した発現ベクターpAce3およびpAce4をHindIIIおよびSacIで消化し、Ace-AMP1発現カセットを含むフラグメントをHindIII-SacI消化した植物形質転換ベクターpGPTV-KAN（ベッカー（Becker）ら，1992，Plant Mol Biol，20：1195-1197）中へサブクローニングして、それぞれ植物形質転換ベクターpFAJ3033およびpFAJ3034を得た。これらのベクターの模式図を図5に示す。図5に用いた記号は下記のものである：

| | |
|-------|---------------------------|
| RB： | T-DNAの右端 |
| LB： | T-DNAの左端 |
| Tnos： | T-DNAノパリンシンターゼ遺伝子のターミネーター |

| | |
|-----------|--|
| CTPP : | Ace-AMP1 cDNAのカルボキシ末端プロペプチドドメイン |
| MP : | Ace-AMP1 cDNAの成熟蛋白質ドメイン |
| SP : | Ace-AMP1 cDNAのシグナルペプチドドメイン |
| AMV : | アルファルファモザイクウイルス5' 側リーダー配列 |
| Penh35S : | 重複エンハンサー領域をもつカリフラワーモザイクウイルスの35S RNAのプロモーター |
| Pnos | T-DNAノパリンシンターゼ遺伝子のプロモーター |
| nptII : | ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII遺伝子のコード領域 |
| Tg7 : | T-DNA遺伝子7のターミネーター |

実施例12

植物の形質転換

攻撃力を失わせた (disarmed) Agrobacterium tumefaciens LBA4404株 (pAL4404) (ヘケマ (Hoekema) ら, 1983, Nature, 303:179-180) をフラモンド (Framond) ら (BioTechnology, 1:262-269) の方法により形質転換ベクターで形質転換する。

ホーシュ (Horsch) ら (1985, Science, 227:1229-1231) の方法に基づいて Nicotiana tabacum Samsunの葉のディスクを使用し、pFAJ3033またはpFAJ3034を保有する Agrobacterium 株と共培養して、タバコの形質転換を実施する。共培養 (co-cultivation) はカナマイシン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の選択圧 (selection pressure) の下で実施される。カナマイシン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含有する培地上でトランスジェニック植物が再生される。これらのトランスジェニック植物を、新たに導入された遺伝子の発現につき標準的ウェスタンブロット法により分析することができる。導入された遺伝子を構成的に発現しうる植物を選択し、自家受粉させて、種子を形成させることができ

る。トランスジェニック植物のF1若木を植物病原体に対して増大した抵抗性につきさらに分析することができる。

配列表

配列番号 : 1

配列の特徴 :

長さ : 93 アミノ酸

型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

分子の種類 : 蛋白質

起源 :

生物名 : Ace-AMP 1

配列 :

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|
| Gln | Asn | Ile | Cys | Pro | Arg | Val | Asn | Arg | Ile | Val | Thr | Pro | Cys | Val | Ala | 1 | 5 | 10 | 15 |
| Tyr | Gly | Leu | Gly | Arg | Ala | Pro | Ile | Ala | Pro | Cys | Cys | Arg | Ala | Leu | Asn | 20 | 25 | 30 | |
| Asp | Leu | Arg | Phe | Val | Asn | Thr | Arg | Asn | Leu | Arg | Arg | Ala | Ala | Cys | Arg | 35 | 40 | 45 | |
| Cys | Leu | Val | Gly | Val | Val | Asn | Arg | Asn | Pro | Gly | Leu | Arg | Arg | Asn | Pro | 50 | 55 | 60 | |
| Arg | Phe | Gln | Asn | Ile | Pro | Arg | Asp | Cys | Arg | Asn | Thr | Phe | Val | Arg | Pro | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Phe | Trp | Trp | Arg | Pro | Arg | Ile | Gln | Cys | Gly | Arg | Ile | Asn | 85 | 90 | | | | | |

配列番号 : 2

配列の特徴 :

長さ : 42 アミノ酸

型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

分子の種類 : 蛋白質

起源 :

生物名：R s - n s L T P

配列：

```

Ala Leu Ser Cys Gly Thr Val Asn Ser Leu Asn Ala Ala Cys Ile Gly
1           5           10           15
Tyr Leu Thr Gln Asn Ala Pro Leu Ala Arg Gly Cys Cys Thr Gly Val
          20           25           30
Thr Asn Leu Asn Asn Met Ala Thr Thr Pro
          35           40

```

配列番号：3

配列の特徴：

長さ：91アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：S o - n s L T P

配列：

```

Gly Ile Thr Cys Gly Met Val Ser Ser Lys Leu Ala Pro Cys Ile Gly
1           5           10           15
Ile Leu Lys Gly Gly Pro Leu Gly Gly Gly Cys Cys Gly Gly Ile Lys
          20           25           30
Ala Leu Asn Ala Ala Ala Ala Thr Thr Pro Asp Arg Lys Thr Ala Cys
          35           40           45
Asn Cys Leu Lys Ser Ala Ala Asn Ala Ile Lys Gly Ile Asn Tyr Gly
          50           55           60
Lys Ala Ala Gly Leu Pro Gly Met Cys Gly Val His Ile Pro Tyr Ala
          65           70           75           80
Ile Ser Pro Ser Thr Asn Cys Asn Ala Val His
          85           90

```

配列番号：4

配列の特徴：

長さ：94アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：EP2

配列：

```

Val Leu Thr Cys Gly Gln Val Thr Gly Ala Leu Ala Pro Cys Leu Gly
1           5           10           15
Tyr Leu Arg Ser Gln Val Asn Val Pro Val Pro Leu Thr Cys Cys Asn
20          25          30
Val Val Arg Gly Leu Asn Asn Ala Ala Arg Thr Thr Leu Asp Arg Lys
35          40          45
Thr Ala Cys Gly Cys Leu Lys Gln Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Leu
50          55          60
Asn Leu Asn Ala Ala Ala Gly Leu Pro Ala Arg Cys Gly Val Asn Ile
65          70          75          80
Pro Tyr Lys Ile Ser Pro Thr Thr Asp Cys Asn Arg Val Val
85          90

```

配列番号：5

配列の特徴：

長さ：91アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：To b L T P

配列：

```

Ala Leu Ser Cys Gly Gln Val Gln Ser Gly Leu Ala Pro Cys Leu Pro
1           5           10           15
Tyr Leu Gln Gly Arg Gly Pro Leu Gly Ser Cys Cys Gly Gly Val Lys
          20           25           30
Gly Leu Leu Gly Ala Ala Lys Ser Leu Ser Asp Arg Lys Thr Ala Cys
          35           40           45
Ile Cys Leu Lys Ser Ala Ala Asn Ala Ile Lys Gly Ile Asp Met Gly
          50           55           60
Lys Ala Ala Gly Leu Pro Gly Ala Cys Gly Val Asn Ile Pro Tyr Lys
65           70           75           80
Ile Ser Pro Ser Thr Asp Cys Ser Lys Val Gln
          85           90

```

配列番号 : 6

配列の特徴 :

長さ : 91 アミノ酸

型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

分子の種類 : 蛋白質

起源 :

生物名 : L e - n s L T P

配列 :

```

Ala Leu Thr Cys Gly Gln Val Thr Ala Gly Leu Ala Pro Cys Leu Pro
1           5           10           15
Tyr Leu Gln Gly Arg Gly Pro Leu Gly Gly Cys Cys Gly Gly Val Lys
          20           25           30
Asn Leu Leu Gly Ser Ala Lys Thr Thr Ala Asp Arg Lys Thr Ala Cys
          35           40           45
Thr Cys Leu Lys Ser Ala Ala Asn Ala Ile Lys Gly Ile Asp Leu Asn
          50           55           60
Lys Ala Ala Gly Ile Pro Ser Val Cys Lys Val Asn Ile Pro Tyr Lys
65           70           75           80
Ile Ser Pro Ser Thr Asp Cys Ser Thr Val Gln
          85           90

```


配列番号：7

配列の特徴：

長さ：92アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：CB-A

配列：

```

Val Asp Cys Gly Gln Val Asn Ser Ser Leu Ala Ser Cys Ile Pro Phe
1          5          10          15
Leu Thr Gly Gly Val Ala Ser Pro Ser Ala Ser Cys Cys Ala Gly Val
20          25          30
Gln Asn Leu Lys Thr Leu Ala Pro Thr Ser Ala Asp Arg Arg Ala Ala
35          40          45
Cys Glu Cys Ile Lys Ala Ala Ala Ala Arg Phe Pro Thr Ile Lys Gln
50          55          60
Asp Ala Ala Ser Ser Leu Pro Lys Lys Cys Gly Val Asp Ile Asn Ile
65          70          75          80
Pro Ile Ser Lys Thr Thr Asn Cys Gln Ala Ile Asn
85          90

```

配列番号：8

配列の特徴：

長さ：92アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：CB-C

配列:

```

Val Asn Cys Gly Gln Val Asn Lys Ala Leu Ser Ser Cys Val Pro Phe
 1           5           10           15
Leu Thr Gly Phe Asp Thr Thr Pro Ser Leu Thr Cys Cys Ala Gly Val
          20           25           30
Met Leu Leu Lys Arg Leu Ala Pro Thr Val Lys Asp Lys Arg Ile Ala
      35           40           45
Cys Glu Cys Val Lys Thr Ala Ala Ala Arg Tyr Pro Asn Ile Arg Glu
 50           55           60
Asp Ala Ala Ser Ser Leu Pro Tyr Lys Cys Gly Val Val Ile Asn Val
 65           70           75           80
Pro Ile Ser Lys Thr Thr Asn Cys His Glu Ile Asn
          85           90

```

配列番号: 9

配列の特徴:

長さ: 92 アミノ酸

型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

分子の種類: 蛋白質

起源:

生物名: CB-B

配列:

```

Ala Val Pro Cys Ser Thr Val Asp Met Lys Ala Ala Ala Cys Val Gly
 1           5           10           15
Phe Ala Thr Gly Lys Asp Ser Lys Pro Ser Gln Ala Cys Cys Thr Gly
          20           25           30
Leu Gln Gln Leu Ala Gln Thr Val Lys Thr Val Asp Asp Lys Lys Ala
      35           40           45
Ile Cys Arg Cys Leu Lys Ala Ser Ser Lys Ser Leu Gly Ile Lys Asp
 50           55           60
Gln Phe Leu Ser Lys Ile Pro Ala Ala Cys Asn Ile Lys Val Gly Phe
 65           70           75           80

```

Pro Val Ser Thr Asn Thr Asn Cys Glu Thr Ile His
85 90

配列番号：10

配列の特徴：

長さ：93アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：P A P I

配列：

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|
| Ala | Leu | Asn | Cys | Gly | Gln | Val | Asp | Ser | Lys | Met | Lys | Pro | Cys | Leu | Thr | 1 | 5 | 10 | 15 |
| Tyr | Val | Gln | Gly | Gly | Pro | Gly | Gly | Pro | Ser | Gly | Leu | Cys | Cys | Asn | Gly | 20 | 25 | 30 | |
| Val | Arg | Asp | Leu | His | Asn | Gln | Ala | Gln | Ser | Ser | Gly | Asp | Arg | Gln | Thr | 35 | 40 | 45 | |
| Val | Cys | Asn | Cys | Leu | Lys | Gly | Ile | Ala | Arg | Gly | Ile | His | Asn | Leu | Asn | 50 | 55 | 60 | |
| Leu | Asn | Asn | Ala | Ala | Ser | Ile | Pro | Ser | Lys | Cys | Asn | Val | Asn | Val | Pro | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Tyr | Thr | Ile | Ser | Pro | Asp | Ile | Asp | Cys | Ser | Arg | Ile | Tyr | 85 | 90 | | | | | |

配列番号：11

配列の特徴：

長さ：90アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：CW18

配列：

```

Ala Ile Thr Cys Gly Gln Val Ser Ser Ala Leu Gly Pro Cys Ala Ala
 1           5           10           15
Tyr Ala Lys Gly Ser Ser Thr Ser Pro Ser Ala Gly Cys Cys Ser Gly
          20           25           30
Val Lys Arg Leu Ala Gly Leu Ala Arg Ser Thr Ala Asp Lys Gln Ala
          35           40           45
Thr Cys Arg Cys Leu Lys Ser Val Ala Gly Ala Tyr Asn Ala Gly Arg
          50           55           60
Ala Ala Gly Ile Pro Ser Arg Cys Gly Val Ser Val Pro Tyr Thr Ile
          65           70           75           80
Ser Ala Ser Val Asp Cys Ser Lys Ile His
          85           90

```

配列番号：12

配列の特徴：

長さ：90アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：CW21

配列：

```

Ala Ile Ser Cys Gly Gln Val Ser Ser Ala Leu Ser Pro Cys Ile Ser
 1           5           10           15
Tyr Ala Arg Gly Asn Gly Ala Lys Pro Pro Ala Ala Cys Cys Ser Gly
          20           25           30
Tyr Lys Arg Leu Ala Gly Ala Ala Gln Ser Thr Ala Asp Lys Gln Ala
          35           40           45

```

Thr Cys Arg Cys Ile Lys Ser Ala Ala Gly Gly Leu Asn Ala Gly Lys
 50 55 60
 Ala Ala Gly Ile Pro Ser Met Cys Gly Val Ser Val Pro Tyr Ala Ile
 65 70 75 80
 Ser Ala Ser Val Asp Cys Ser Lys Ile Arg
 85 90

配列番号：13

配列の特徴：

長さ：90アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：T a - n s L T P

配列：

Ile Asp Cys Gly His Val Asp Ser Leu Val Arg Pro Cys Leu Ser Tyr
 1 5 10 15
 Val Gln Gly Gly Pro Gly Pro Ser Gly Gln Cys Cys Asp Gly Val Lys
 20 25 30
 Asn Leu His Asn Gln Ala Arg Ser Gln Ser Asp Arg Gln Ser Ala Cys
 35 40 45
 Asn Cys Leu Lys Gly Ile Ala Arg Gly Ile His Asn Leu Asn Glu Asp
 50 55 60
 Asn Ala Arg Ser Ile Pro Pro Lys Cys Gly Val Asn Leu Pro Tyr Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Leu Asn Ile Asp Cys Ser Arg Val
 85 90

配列番号：14

配列の特徴：

長さ：93アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：Zm-n s L T P

配列：

```

Ala Ile Ser Cys Gly Gln Val Ala Ser Ala Ile Ala Pro Cys Ile Ser
1           5           10           15
Tyr Ala Arg Gly Gln Gly Ser Gly Pro Ser Ala Gly Cys Cys Ser Gly
20           25           30
Val Arg Ser Leu Asn Asn Ala Ala Arg Thr Thr Ala Asp Arg Arg Ala
35           40           45
Ala Cys Asn Cys Leu Lys Asn Ala Ala Ala Gly Val Ser Gly Leu Asn
50           55           60
Ala Gly Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Lys Cys Gly Val Ser Ile Pro
65           70           75           80
Tyr Thr Ile Ser Thr Ser Thr Asp Cys Ser Arg Val Asn
85           90

```

配列番号：15

配列の特徴：

長さ：686塩基対

型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：cDNA

起源：

生物名：Ace-AMP1

配列：

```

AACGAAAATT ACGAAATTAC ATCAATATCT CGAGCCATGG TTCGCGTTGT ATCITTACTT      60
GCAGCATCGA CCTTCATACT GTTGATTATG ATAATCAGCA GTCCGTATGC AAATAGTCAG      120

```

```

AACATATGCC CAAGGGTTAA TCGAATTGTG ACACCCTGTG TGGCCTACGG ACTCGGAAGG      180
GCACCAATCG CCCCATGCTG CAGAGCCCTG AACGATCTAC GGTTTGTGAA TACTAGAAAC      240
CTACGACGTG CTGCATGCCG CTGCCTCGTA GGGGTAGTGA ACCGGAACCC CGGTCTGAGA      300
CGAAACCCTA GATTTTCAGAA CATTCTCTGT GATTGTGCGA ACACCTTTGT TCGTCCCTTC      360
TGGTGGCGTC CAAGAATTCA ATGCGGCAGG ATTAACCTTA CGGATAAGCT TATATACTTG      420
GACGCTGAGG AATGAAGACT AGGCTCTACT GTTATGCACT ATAGTTTATA GTATATATAC      480
TAAATAAAAC AGTATGTGCT GTATAATTTG CAATATGGAC TTATTTATAG CAAGTCCTAA      540
TGGTGTCTGC TACTTGGGTC CAGCATTGAG CACTATATAG GCACTATATA GGGTACTATG      600
GGCTGATTAT GATGTCAACG GCGGTACTTT ATCTTACATA AATAAATAAT GGGTTTATCT      660
TGCTTGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA      686

```

配列番号：16

配列の特徴：

長さ：132アミノ酸

型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：蛋白質

起源：

生物名：Ace-AMP1（翻訳されたもの）

配列：

```

Met Val Arg Val Val Ser Leu Leu Ala Ala Ser Thr Phe Ile Leu Leu
1           5           10          15
Ile Met Ile Ile Ser Ser Pro Tyr Ala Asn Ser Gln Asn Ile Cys Pro
20          25          30
Arg Val Asn Arg Ile Val Thr Pro Cys Val Ala Tyr Gly Leu Gly Arg
35          40          45
Ala Pro Ile Ala Pro Cys Cys Arg Ala Leu Asn Asp Leu Arg Phe Val
50          55          60
Asn Thr Arg Asn Leu Arg Arg Ala Ala Cys Arg Cys Leu Val Gly Val
65          70          75          80

```

Val Asn Arg Asn Pro Gly Leu Arg Arg Asn Pro Arg Phe Gln Asn Ile
 85 90 95

Pro Arg Asp Cys Arg Asn Thr Phe Val Arg Pro Phe Trp Trp Arg Pro
 100 105 110

Arg Ile Gln Cys Gly Arg Ile Asn Leu Thr Asp Lys Leu Ile Tyr Leu
 115 120 125

Asp Ala Glu Glu
 130

配列番号：17

配列の特徴：

長さ：39塩基対

型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：cDNA

起源：

生物名：OWB114

配列：

CCACTCTAGA GAATTCACCT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

39

配列番号：18

配列の特徴：

長さ：32塩基対

型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：cDNA

起源：

生物名：OWB116

配列：

AGAATTGCA TTGCATCGGA TCCATGATCG AT

32

配列番号：19

配列の特徴：

長さ：25塩基対

型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：cDNA

起源：

生物名：OWB117

配列：

ATCGATCATG GATCCGATGC AATGC

25

配列番号：20

配列の特徴：

長さ：29塩基対

型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：cDNA

起源：

生物名：OWB111

配列：

AATTCTAGAC CNMGNTTYCA RAAATGCC

29

配列番号：21

配列の特徴：

長さ：35塩基対

型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：cDNA

起源：

生物名：OWB132

配列：

ATCGGATCCG AATTCGTGTT GCGACAATCA CGAGG

35

配列番号：22

配列の特徴：

長さ：35塩基対

型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：cDNA

起源：

生物名：OWB133

配列：

ATCGGATCCG AATTCAGGAC GAACAAAGGT GTTGC

35

配列番号：23

配列の特徴：

長さ：26塩基対

型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

分子の種類：cDNA

起源：

生物名 : OWB158

配列 :

TAAGGTACCA TGGTTCGCGT TGTATC

26

配列番号 : 24

配列の特徴 :

長さ : 37塩基対

型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

分子の種類 : cDNA

起源 :

生物名 : OWB159

配列 :

TAAGGATCCT TCAGTTAATC CTGCCGCATT GAATTCG

37

配列番号 : 25

配列の特徴 :

長さ : 30塩基対

型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

分子の種類 : cDNA

起源 :

生物名 : OWB160

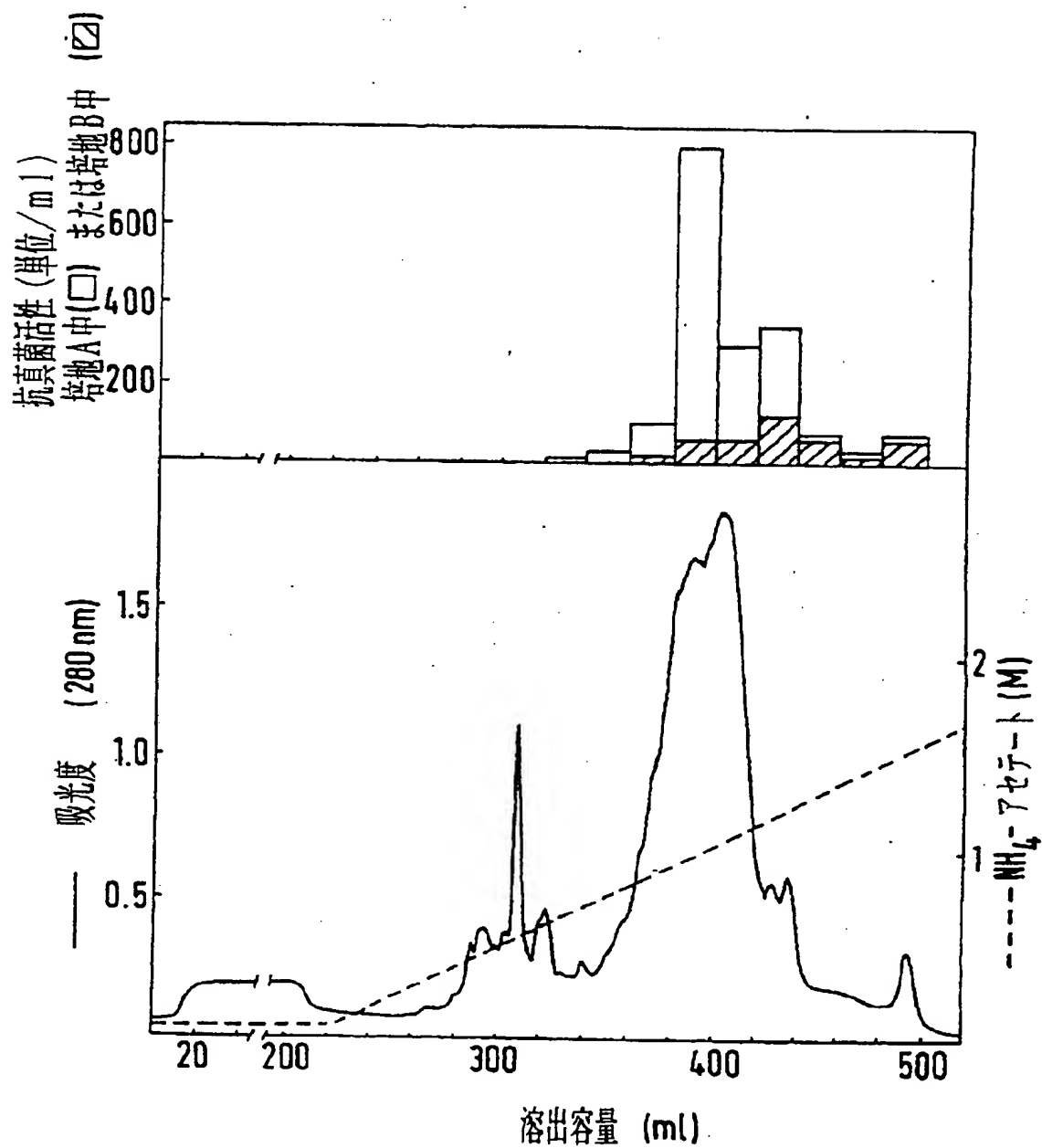
配列 :

TAAGGATCCC TTCATTCTC AGCGTCCAAG

30

【図1】

FIG. 1



【図2】

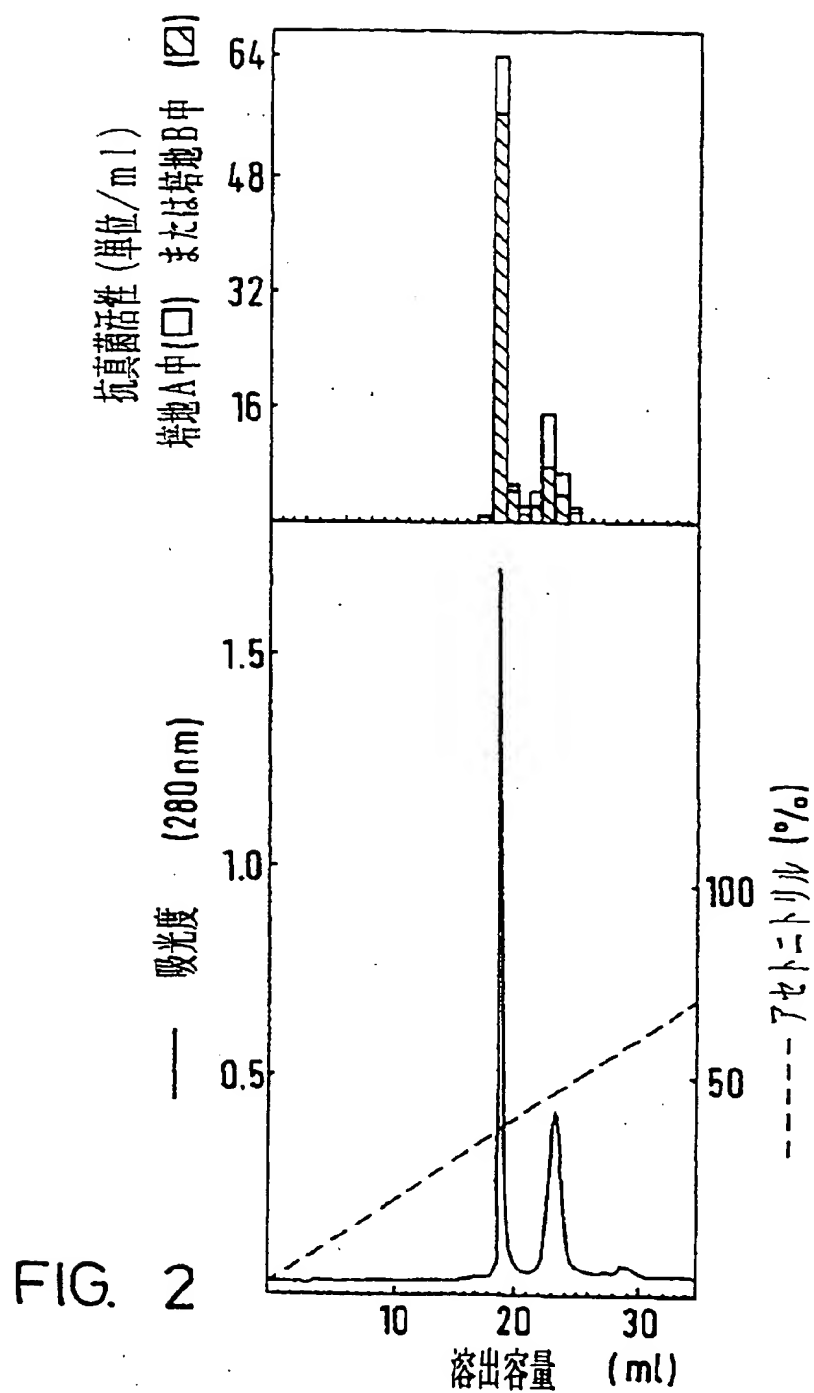


FIG. 2

FIG. 3.

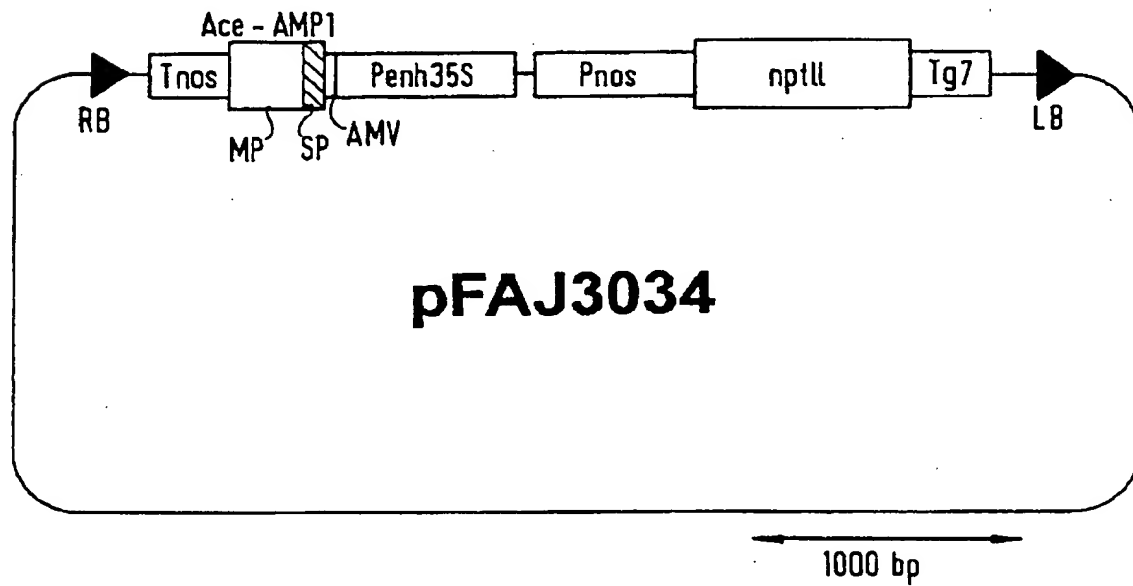
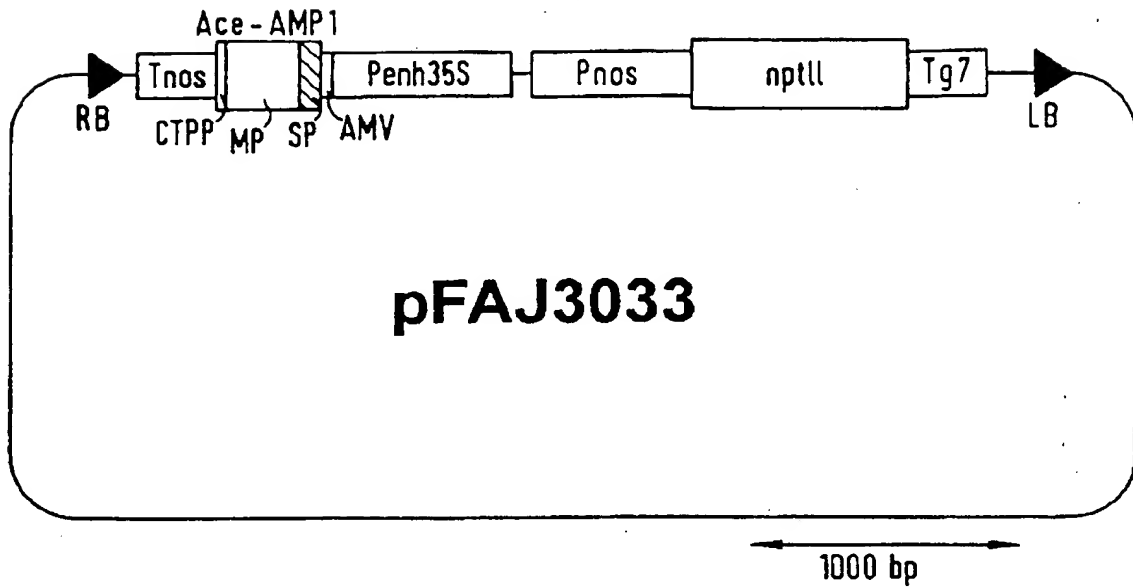
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
|----------|--------------|----------------|-----------------|--------------|------------|------------|------------|----------------|--------------------------|
| Ace-AMP1 | QNICPRVNRIVT | PCVAYGLGRA-- | PIA-PCCRALNDLR- | FVTRNLRAARCL | VGVVNRNPG | LRRNPRFQNI | PRDCRNTFVR | PFWRPRIO | CGGRIN |
| Rs-nsLTP | ALSCGTVNSL | NAACIGYLTQNA-- | PLARGCCTGV | TNLNNMA?TTP | ???????? | ???????? | ???????? | ???????? | ???? |
| So-nsLTP | GITCGWSSKL | APCIGILKGG-- | PLGGCCGGIK | ALNAAATTP | DRKTACNCL | KSANAIGIN | YGKAAG-L | PGMC-GVHI- | PYAI |
| BP2 | VLTCGQVTG | ALAPCLG | YLRSQVNV | PVPLTCCNV | VRGLNNAART | TLDRKTAC | GCGLQTANAV | TGLNNAAG-L | PARC-GVNI- |
| TobLTP | ALSCGQVQ | SSGLAPCL | PYLQGRG-- | PLG-SCCG | GVKGLLGA | AKSLDRKTAC | ICLKSAANA | IKGIDMKAAG-L | PGAC-GVNI- |
| Le-nsLTP | ALTCCGQV | TAGLAPCL | PYLQGRG-- | PLG-SCCG | GVKGLLGA | AKSLDRKTAC | ICLKSAANA | IKGIDMKAAG-L | PGAC-GVNI- |
| CB-A | -VDCGQVNS | SLASCIP | FLTGGV | ASPSA-SCC | AGVQNLK | TAPTSAD | RRAACECI | KAAARPTIK | QDAASS-L |
| CB-B | -VNCGQVNS | KALSSCV | FLTGTTP | PSL-TCC | AGVMLK | RLAPTVD | KRIACE | CVKTAARY | PNIREDAASS-L |
| CB-C | AVPCSTVD | MAAACV | GATGDS | KPSQ-ACC | TGLQLAQ | TVKTVDD | KKAI | CRCLKASS | KL-GIKDQFLSK- |
| PAP1 | ALNCGQVDS | KMKPCL | TYVQGG | PGPSG-LCC | NGVRDL | HNQAQSS | GDRTVC | NCLKG | IARGIHNLNNAAS- |
| CW18 | AITCGQVSS | ALGP | CAAYAK | GSSTPSA-GCC | SGVRLA | GLARSTAD | KQATCR | CLKSVAGAY-NA-- | GRAAG-IP |
| CW21 | AISCGQVSS | ALSPCIS | YARGNG | AKPPA-ACC | SGYKRL | AGAAQSTAD | KQATCR | CIKSAAGGL-NA-- | GKAAG-IP |
| Ta-nsLTP | -IDCGHVD | SLVRPCL | SYVQGG | PG-PSG-QCC | DGVN | LNHQAQSS | QDRQSA | CNCLKG | IARGIHNLNNAAS- |
| Zm-nsLTP | AISCGQV | ASAIA | PCISYAR | GQGGPSA-GCC | SGVRS | LNNAARTTAD | RRAACN | CLKNAAAG | USGLNAGNAAS-IP |
| | | | | | | | | | PSKC-GVSI-PYTISTSTDCSRVN |

FIG. 4

— 55 —

【図 5】

FIG. 5



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K14/415 C12N15/29 A01N65/00 | | International Application No. PCT/GB 94/01636 |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A01N C12N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO,A,92 15691 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 17 September 1992 cited in the application | |
| A | WO,A,92 20801 (UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID) 26 November 1992 | |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 17 October 1994 | | Date of mailing of the international search report 08 -11- 1994 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2180 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Hermann, R |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No.

PCT/GB 94/01636

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9215691 | 17-09-92 | AU-B- 652430 | 25-08-94 |
| | | AU-A- 1366492 | 06-10-92 |
| | | BR-A- 9205760 | 23-08-94 |
| | | EP-A- 0576483 | 05-01-94 |
| | | JP-T- 6505160 | 16-06-94 |
| WO-A-9220801 | 26-11-92 | AU-A- 1750092 | 30-12-92 |
| | | EP-A- 0540709 | 12-05-93 |
| | | JP-T- 5508423 | 25-11-93 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

| (51) Int. Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | |
|----------------------------|------|---------|---------------|---|
| C 1 2 N 5/10 | | 9637-4B | C 1 2 P 21/02 | C |
| 15/09 | | 9450-4H | A 0 1 N 65/00 | A |
| C 1 2 P 21/02 | | 9162-4B | C 1 2 N 15/00 | A |
| // A 0 1 N 65/00 | | 9281-4B | 5/00 | B |
| (C 1 2 N 1/21 | | | | |
| C 1 2 R 1:38) | | | | |
| (C 1 2 N 1/21 | | | | |
| C 1 2 R 1:19) | | | | |
| (C 1 2 P 21/02 | | | | |
| C 1 2 R 1:38) | | | | |
| (C 1 2 P 21/02 | | | | |
| C 1 2 R 1:91) | | | | |
| (C 1 2 P 21/02 | | | | |
| C 1 2 R 1:19) | | | | |

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, GE, HU, JP, KE, KG, K P, KR, KZ, LK, LT, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN

(72)発明者 リーズ, サラ・ブロンウェン
イギリス国パークシャー アールジー12
3エックスエックス, ブラックネル, フォ
レスト・パーク, マイケルデヴァー・ウェ
イ 32

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.